

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

51

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



Int. Cl.:

C 07 d, 101/00

A 61 k, 21/00

C 12 d, 9/00

52

Deutsche Kl.: 12 q, 24

30 h, 6

6 b, 16/03

10

11

Offenlegungsschrift 2022 452

21

Aktenzeichen: P 20 22 452.6

22

Anmeldetag: 8. Mai 1970

43

Offenlegungstag: 17. Dezember 1970

Ausstellungspriorität: —

30

Unionspriorität

32

Datum: 14. Mai 1969 10. September 1969

33

Land: Schweiz

31

Aktenzeichen: 7349-69 13485-69

54

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung eines neuen Antibioticums

61

Zusatz zu: —

62

Ausscheidung aus: —

71

Anmelder: Sandoz AG, Basel (Schweiz)

Vertreter: Schalk, Dr. W.; Wirth, Dipl.-Ing. P.; Dannenberg, Dipl.-Ing. G. E. M.;
Schmied-Kowarzik, Dr. V.; Weinhold, Dr. P.; Gudcl, Dr. D.;
Patentanwälte, 6000 Frankfurt

72

Als Erfinder benannt: Hauser, Dr. Daniel, Reinach (Schweiz)

Benachrichtigung gemäß Art. 7 § 1 Abs. 2 Nr. 1 d. Ges. v. 4. 9. 1967 (BGBl. I S. 960): —

DT 2022452

Sandoz AG
Basel

Case 100-3072

Verfahren zur Herstellung eines neuen Antibioticums

Die vorliegende Erfindung betrifft das neue Antibioticum
11-Desacetoxy-wortmannin (Formel I, siehe Formelblatt),
Verfahren zur Herstellung von 11-Desacetoxy-wortmannin und
5 pharmazeutische Zubereitungen davon.

Erfindungsgemäss gelangt man zu 11-Desacetoxy-wortmannin,
indem man entweder

- a) $\Delta^{9(11)}$ -8,9-Dihydro-11-desacetoxy-wortmannin (Formel II)
isomerisiert oder
- 10 b) einen neuen Stamm der Pilzspecies *Penicillium funicu-*
losum Thom bzw. der Pilzspecies *Aspergillus janus* Raper
und Thom auf oder in einem Nährmedium züchtet und hier-
auf 11-Desacetoxy-wortmannin aus der Fermentationsbrühe
auf an sich bekannte Weise, z.B. durch Extraktion oder
15 Adsorption, isoliert und reinigt.

Nach a) wird die Isomerisierung in einer wasserfreien organischen Base durchgeführt. Grundsätzlich sind alle organischen Basen verwendbar, vorzugsweise jedoch organische Stickstoffbasen, wie Pyridin oder Chinolin. Da auch die erfindungsgemäße Isomerisierung bei erhöhter Temperatur schneller abläuft, wird sie beispielsweise bei der Siedetemperatur der organischen Base durchgeführt.

Eine Ausführungsform des Verfahrens besteht darin, dass man $\Delta^9(11)$ -8,9-Dihydro-11-desacetoxy-wortmannin in Pyridin löst und unter Stickstoff am Rückfluss kocht. Das entstandene 11-Desacetoxy-wortmannin wird nach dem Eindampfen durch Umkristallisation in an sich bekannter Weise gereinigt.

Das als Ausgangsprodukt verwendete $\Delta^9(11)$ -8,9-Dihydro-11-desacetoxy-wortmannin kann hergestellt werden durch Umsetzung von Wortmannin (Formel III) mit Zinkstaub in einem organischen Lösungsmittel in Gegenwart einer Säure, aber in Abwesenheit von Wasser, beispielsweise bei der Siedetemperatur des organischen Lösungsmittels. Die Ausgangsverbindung wird nach Abfiltrieren des Zinkstaubes und Eindampfen des Reaktionsgemisches durch Umkristallisieren und/oder Chromatographieren in an sich bekannter Weise gereinigt.

Nach b) gelangt man zu 11-Desacetoxy-wortmannin, indem man als Ausgangsmaterial entweder einen neuen Stamm der Pilz-

species *Penicillium funiculosum* Thom oder einen neuen Stamm der Pilzspecies *Aspergillus janus* Raper und Thom verwendet.

Der neue, erfindungsgemäss verwendete Stamm S 3196 von *Penicillium funiculosum* Thom wurde aus einer in Clarksburg,
5 Maryland (USA) gefundenen Erdprobe isoliert und eine Probe davon beim United States Department of Agriculture (Northern Utilization Research and Development Division), Peoria, Ill., USA, unter der Nummer NRRL 3363 deponiert. Der neue Stamm der Pilzspecies *Penicillium funiculosum* Thom wächst auf
10 einem Malz-Hefeextrakt-Agar bei 18-27° und bildet einen dichten grünen Konidienrasen mit leuchtend gelben Konidienträgern. Die Rückseite der Kolonie zeigt eine grüngelbe Verfärbung des Substrats.

Der Stamm entspricht in seiner Morphologie und Physiologie
15 der Beschreibung von C. Thom, U.S.Dept.Agr.Bur.Anim.Ind.Bul. 118, p. 69, fig. 27 (1910) und ist im Handbuch K.B. Raper und Ch. Thom, "A Manual of the *Penicillia*", The Williams and Wilkins Co. 1949, Baltimore, auf den Seiten 616 bis 620 eingehend beschrieben und illustriert.

20 Der neue, erfindungsgemäss verwendete Stamm S 8033/F von *Aspergillus janus* wurde aus einer in der Republik Zentralafrika gefundenen Erdprobe isoliert und eine Probe davon beim United States Department of Agriculture (Northern Utilization Research and Development Division), Peoria, Ill.,

USA, unter der Nummer NRRL 3807 deponiert und ist dort zugänglich.

Der neue Stamm der Pilzspecies *Aspergillus janus* wächst auf einem Glucose-Hefeextrakt-Malzextrakt-Pepton-Agar bei
5 18 bis 33°C, wird aber vorzugsweise bei 18 bis 27° gezüchtet. Auf diesem Medium wächst der Pilz mit einem lockeren, ausgebreiteten Mycel. Das Nährsubstrat und die Rückseite der Kolonie werden durch ein gelbliches Pigment verfärbt. In seiner Morphologie und Physiologie entspricht der neue
10 Stamm von *Aspergillus janus* der Beschreibung bei: K.B. Raper und D.J. Fennell, "The Genus *Aspergillus*", The Williams & Wilkins Comp., Baltimore, 1965, auf den Seiten 476 bis 480.

Für das erfindungsgemäße Verfahren können auch Stämme verwendet werden, wie sie z.B. durch Selektion oder Mutation
15 unter Einwirkung von Ultraviolett- oder Röntgenstrahlen oder durch Anwendung anderer Massnahmen, wie z.B. durch Behandlung von Laboratoriumskulturen mit geeigneten Chemikalien, aus den neuen Stämmen der Pilzspecies *Penicillium funiculosum* Thom bzw. der Pilzspecies *Aspergillus janus* Raper und
20 Thom gewonnen werden können.

Die neuen Pilzstämme der Pilzspecies *Penicillium funiculosum* Thom bzw. der Pilzspecies *Aspergillus janus* Raper und Thom lassen sich auf vielerlei Nährböden, die die üblichen Nähr-

stoffe enthalten, züchten. So verwenden solche Stämme die für kohlenstoffheterotrophe Organismen üblicherweise benutzten Nährstoffe, beispielsweise Glucose, Stärke, Dextrin, Lactose, Rohrzucker usw. als Kohlenstoffquelle, organische und anorganische, stickstoffhaltige Verbindungen, wie Pepton, Hefe- oder Fleischextrakte, Ammoniumsulfat, Ammoniumnitrat, Aminosäuren usw. als Stickstoffquelle sowie die üblichen Mineralsalze und Spurenelemente.

11-Desacetoxy-wortmannin kann man in der Weise herstellen, dass man ein flüssiges Nährmedium direkt mit einer Sporensuspension oder mit einer über eine Sporensuspension hergestellten Vorkultur eines neuen Stammes von *Penicillium funiculosum* Thom bzw. von *Aspergillus janus* Raper und Thom beimpft. Im Falle des Stammes von *Penicillium funiculosum* Thom wird die Kultur 5 bis 10 Tage bei 27°, im Falle des Stammes von *Aspergillus janus* Raper und Thom 3 bis 4 Tage bei 18° inkubiert. Die Züchtung kann unter aeroben Bedingungen in einer Oberflächenkultur oder submers unter Schütteln oder in Fermentern mit Begasung durch Luft oder Sauerstoff unter Rühren erfolgen. Sobald eine maximale Menge an Antibioticum produziert worden ist, wird filtriert und das Antibioticum durch extraktive oder adsorptive Arbeitsmethoden auf an sich bekannte Weise aus dem Filtrat gewonnen.

Eine Methode, die sich als vorzugsweise geeignet erwiesen hat,

ist die Extraktion des Filtrates mit Essigester, jedoch können auch andere organische Lösungsmittel, wie z.B. Benzol, Chloroform, Butylacetat, Methylenchlorid oder Butanol, verwendet werden. Anschliessend werden die Extrakte vom

5 Lösungsmittel befreit, z.B. durch Destillation, und der Rückstand zur Isolierung des gewünschten Antibioticums auf chromatographischem Wege an adsorbierenden Mitteln, wie Tonerde, Kieselgel, Magnesiumsilicat und dergleichen oder mittels Gegenstromverteilung gereinigt.

11-Desacetoxy-wortmannin ist ein wertvolles Heilmittel.

10 Insbesondere besitzt es eine sehr hohe fungistatische Wirkung gegenüber verschiedenen Erregern von Pilzinfektionen humanpathogener oder pflanzenparasitärer Pilze. In vitro zeigt sich 11-Desacetoxy-wortmannin besonders wirksam gegen Histoplasma capsulatum, Candida krusei, Trichophyton tonsu-

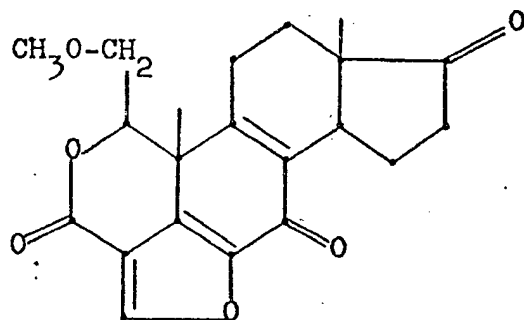
15 rans, Epidermophyton floccosum und Microsporum canis.

11-Desacetoxy-wortmannin zeigt überdies eine ödemhemmende und entzündungshemmende Wirksamkeit, wie sie aus dem Carrageen-Oedem-Test, dem Carrageen-Granulombeutel-Test und dem CMC-Granulombeutel-Test an der wachen Ratte hervorgeht.

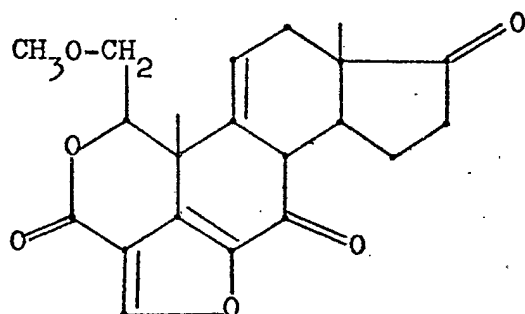
20 Die zu verabreichende Dosis variiert naturgemäss je nach der Art der Administration und des zu behandelnden Zustands. Im allgemeinen werden jedoch befriedigende Resultate mit einer Dosis von 1 bis 15 mg/kg Körpergewicht erhalten. Diese Dosis

kann nötigenfalls in 2 bis 3 Anteilen oder auch als Retard-
form verabreicht werden. Für grössere Säugetiere liegt die
Tagesdosis bei etwa 1 bis 50 mg. Für die orale Applikation
enthält eine geeignete Verabreichungsform 1 bis 50 mg der
5 Wirksubstanz, vermischt mit einem flüssigen oder festen
Träger. Für die topicale Anwendung können Pulver od. Sprays
od. Salben od. Tinkturen, die 0,1 bis 2 % der Wirksubstanz
enthalten, verwendet werden.

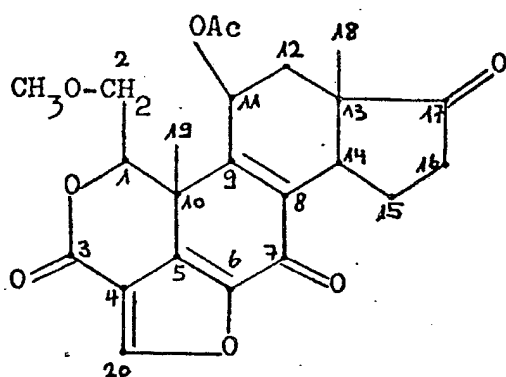
In den nachfolgenden Beispielen, welche die Ausführung des
10 Verfahrens erläutern, den Umfang der Erfindung aber in kei-
ner Weise einschränken sollen, erfolgen alle Temperaturan-
gaben in Celsiusgraden. Die Schmelz- bzw. Zersetzungspunkte
sind auf dem Kofler-Block bestimmt.



I



II



III

009851/2272

JANUARY 1968

Beispiel 1:

5 g $\Delta^{9(11)}$ -8,9-Dihydro-11-desacetoxy-wortmannin werden in 200 ml Pyridin gelöst und 60 Stunden unter Stickstoff am Rückfluss gekocht. Das Reaktionsgemisch wird danach eingedampft und der Rückstand zweimal aus Methanol umkristallisiert. Man erhält reines 11-Desacetoxy-wortmannin vom Smp. 178 - 180°.

Das als Ausgangsmaterial verwendete $\Delta^{9(11)}$ -8,9-Dihydro-11-desacetoxy-wortmannin kann wie folgt hergestellt werden:

10 10 g Wortmannin werden in 1 Liter Aethanol gelöst und nach Zugabe von 10 g Zinkstaub und 10 ml Eisessig 15 Minuten am Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten wird das Reaktionsgemisch filtriert und eingedampft. Der Rückstand wird in Methylenchlorid aufgenommen, filtriert und erneut eingedampft.

15 Anschliessende Umkristallisation aus Methanol liefert rohes $\Delta^{9(11)}$ -8,9-Dihydro-11-desacetoxy-wortmannin. Dieses wird an 260 g Kieselgel chromatographiert. Als Elutionsmittel dient Chloroform/Methanol (49:1), wobei Fraktionen zu 500 ml aufgefangen werden. Die Fraktionen 3 bis 8 werden zusammenge-

20 nommen, das Elutionsmittel verdampft und der Rückstand aus Methylenchlorid unter Zugabe von Methanol umkristallisiert. Smp. 202 - 206°.

Beispiel 2:

In einem Fermenter werden 150 Liter einer Nährlösung, die pro Liter

- 5 20 g Cerelese
 2 g Malzextrakt
 2 g Hefeextrakt

 2 g KH_2PO_4
 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und
10 entmineralisiertes Wasser

- enthält, mit einer Sporensuspension des Stammes NRRL 3363 von *Penicillium funiculosum* Thom. beimpft und unter Belüftung (150 L Luft/Min.) und unter Rühren (100 U./Min.) 112 Stunden bei 27° inkubiert. Die Kulturbrühe wird filtriert und das
15 Filtrat zweimal mit je 100 Liter Essigester extrahiert. Die organische Phase wird einmal mit 60 Liter Wasser gewaschen und am Vakuum auf 5 Liter eingengt. Das Konzentrat wird über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Der
20 Rückstand wird dreimal zwischen Petroläther und Methanol-Wasser (9:1) verteilt. Die Methanolphase wird konzentriert und anschliessend dreimal mit Essigester extrahiert. Die Essigester-Lösungen werden einmal mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Extrakt
25 wird an der 50-fachen Menge Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Methanol (99:1) wird 11-Desacetoxy-wortmannin

009851/2272

BAD ORIGINAL

eluiert, das nach zweimaliger Umkristallisation aus
Methylenchlorid-Aether bei 178-180° schmilzt.

Beispiel 3:

In einem Fermenter werden 30 Liter einer Nährlösung, die pro
5 Liter die in Beispiel 2 angegebene Zusammensetzung aufweist,
mit 3 Liter einer wie nachstehend beschriebenen Vorkultur
des Stammes NRRL 3807 von *Aspergillus janus* beimpft und unter
Belüftung (6-24 L Luft/Min.) und unter Rühren (150 U./Min.)
90 Stunden bei 18° inkubiert. Die Kulturbrühe wird filtriert
10 und das Filtrat zweimal mit je 20 Liter Essigester extrahiert.
Die organische Phase wird einmal mit 12 Liter Wasser gewaschen
und am Vakuum auf 1 Liter eingeeengt. Das Konzentrat wird über
wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Der
Rückstand wird dreimal zwischen Petroläther und Methanol-Wasser
15 (9:1) verteilt. Die Methanolphase wird konzentriert und an-
schliessend dreimal mit Essigester extrahiert. Die Essigester-
Lösungen werden einmal mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem
Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Extrakt wird
an der 50-fachen Menge Kieselgel chromatographiert. Mit
20 Chloroform-Methanol (99:1) wird 11-Desacetoxy-wortmannin
eluiert, das nach zweimaliger Umkristallisation aus Methylen-
chlorid-Aether bei 178-180° schmilzt.

009851/2272

ORIGINAL

Die eingesetzte Vorkultur wird wie folgt erhalten:

- 3 Liter des in Beispiel 2 angegebenen Mediums mit zusätzlich
2 g Pepton pro Liter Lösung werden mit einer Sporensuspension
des Stammes NRRL 3807 beimpft und 7 Tage bei 27° unter
5 Schütteln inkubiert.

Patentansprüche:

1. 11-Desacetoxy-wortmannin (Formel I, siehe Formelblatt).
2. Verfahren zur Herstellung von 11-Desacetoxy-wortmannin
(Formel I, siehe Formelblatt), dadurch gekennzeichnet, dass
5 man entweder
 - a) $\Delta^9(11)$ -8,9-Dihydro-11-desacetoxy-wortmannin (Formel II)
isomerisiert
oder
 - b) einen neuen Stamm der Pilzspecies *Penicillium funiculosum*
10 Thom bzw. der Pilzspecies *Aspergillus janus* Raper und
Thom auf oder in einem Nährmedium züchtet und hierauf
11-Desacetoxy-wortmannin nach an sich bekannten Methoden
aus der Nährlösung isoliert und reinigt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass
15 man als neuen Stamm den Stamm NRRL 3363 der Pilzspecies
Penicillium funiculosum Thom verwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass
man als neuen Stamm den Stamm NRRL 3807 der Pilzspecies
Aspergillus janus Raper und Thom verwendet.
- 20 5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass
man die Isomerisierung in einer wasserfreien organischen Base

durchführt.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man eine organische Stickstoffbase verwendet.

7. Verfahren nach Anspruch 6, gekennzeichnet durch die Verwendung von Pyridin.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass man die Isomerisierung bei erhöhter Temperatur, beispielsweise der Siedetemperatur der organischen Base durchführt.

9. Heilmittel, enthaltend 11-Desacetoxy-wortmannin.

S A N D O Z AG.

Alfred Langen